This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problems Mailbox.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÈTE INTELLECTUELLE Bureau informational



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLICE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classificati a internationale des brevets ³ :	1	(11) Numero de publication internationale:	WO 83/ 02276
C07H 19/20; G01N 53/50 C12Q 1/00	A1	(43) Date de publication internati nale: 7 j	juillet 1983 (07.37.83)

- (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR32/00222
- (22) Date de dépôt international:

29 décembre 1982 (29.12.82)

(31) Numéro de la demande prioritaire:

81/24442

(32) Date de priorité:

29 décembre 1981 (29.12.81)

(33) Pays de priorité:

FR

- (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KOURILSKY, Philippe [FR/FR]: 207, rue de Vaugirard, F-75015 Paris (FR). VINCENT, Christian [FR/FR]: 24, rue du Hameau, F-75015 Paris (FR). TCHEN, Paul [FR/FR]: 18, rue du Télégraphe, F-92000 Nanterre (FR).

- (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Cabinet Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR).
- (81) Etats désignés: BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), GB (brevet européen), IP 115

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

- (54) Title: MODIFIED ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIC ACID AND METHOD FOR DOSING BIOLOGICAL SUBSTANCES CAPABLE OF FIXING DEGRADATION PRODUCTS OF ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIC ACID
- (54) Titre: ACIDE ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIQUE MODIFIE ET PROCEDE DE DOSAGE DE SUBS-TANCES BIOLOGIQUES SUSCEPTIBLES DE FIXER DES PRODUITS DE DEGRADATION DE L'ACIDE ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHORIQUE

(57) Abstract

Modified ATP capable of originating an ADP or AMP, which is also modified, and may be incorporated in biological substances, and allowing the detection and optionally the dosing of the latter. Such modified ATP is characterized by the covalent fixation, on the adenine cycle of the ATP, of a chemical group which may be coupled directly or indirectly with a related molecule, preferably marked by an enzyme, thereby allowing the recognition of said ATP, ADP or AMP.

(57) Abrece

Un ATP modifié susceptible de donner naissance à un ADP ou AMP également modifié, incorporable à des substances biologiques et permettant la détection et éventuellement le dosage de ces dernières. Cet ATP modifié est caractérisé, par la fixation covalente, sur le cycle adénine de l'ATP, d'un groupe chimique couplable directement ou indirectement avec une molécule affine, de préférence marquée par une enzyme, permettant la reconnaissance de cet ATP, ADP ou AMP.

20

Acide adénosine 5'-triphosphorique modifié et procédé de dosage de substances biologiques susceptibles de fixer des produits de dégradation de l'acide adénosine 5'-triphosphorique.

むしょっといいニ ひじニニニ

L'invention est relative à un dérivé de l'acide adénosine 5'-triphosphorique (en d'autres termes à un dérivé de l'ATP) et à un procédé de dosage de substances biologiques susceptibles, en présence de l'enzyme appropriée, d'incorporer un produit de dégradation de l'ATP, en d'autres termes l'acide adénosine 5'-monophosphate (AMP) ou de l'acide adénosine 5'-diphosphate (ADP).

Il est connu qu'une catégorie de substances biologiques, notamment certains antibiotiques, plus particulièrement ceux de la classe des aminoglycosides, sont
capables, en présence d'enzymes spécifiques, d'incorporer de-l'ADP ou de l'AMP, ces dernières molécules étant
susceptibles d'être fournies à cet antibiotique à partir de l'ATP. Cette incorporation est schématisée par
l'équation de réaction suivante, dans laquelle R-OH représente l'antibiotique:

R-OH + ATP enzyme spécifique R-O-AMP + PPi
Les abréviations PPi (pyrophosphate) et Pi
(phosphate) sont quelquefois utilisées en biologie pour désigner les dérivés "inorganiques" du phosphore qui sont libérés à l'occasion de réactions biologiques du type sus-indiqué.

Ce type de réaction est certes déjà utilisé dans des dosages de substances biologiques du type sus-indiqué, mais les moyens de révélation connus deviennent inopérants, lorsque ces substances biologiques ne sont présentes qu'en quantités infimes dans les échantillons étudiés.



L'invention a pour but de fournir des réactifs suffisamment sensibles et permettant précisément l'utilisation de cette réaction pour doser de telles substances biologiques, même lorsqu'elles n'existent dans les échantillons biologiques étudiés qu'en quantités infimes, notamment du nanogramme ou même beaucoup moins.

Le réactif selon l'invention consiste dans un produit de modification de l'ATP, ce produit étant caractérisé par la fixation de façon covalente sur cet ATP d'une 10 molécule chimique portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant par conséquent la reconnaissance sélective des substances biolo-15 giques susdites.

En particulier ce groupe permet une liaison affine chimique ou immunologique avec une molécule ou un produit lui-même directement révélable ou susceptible d'être révélé à son tour par couplage avec un autre produit révélateur. En outre ce groupe est tel qu'il ne modifie pas la capacité de l'enzyme choisie d'assurer l'incorporation du dérivé modifié d'AMP ou d'ADP portant les mêmes groupes de modification que l'ATP modifié initial, dans ou sur la substance à doser, et ce dans les conditions normales d'incorporation de l'AMP ou de l'ADP non modifié sur la même substance en présence de la même enzyme.

L'invention concerne également un procédé de détection ou dosage d'une substance appartenant à la catégorie de substances ci-dessus définie consistant à faire
30 réagir la composition présumée contenir une telle substance avec l'ATP modifié selon l'invention, en présence de
l'enzyme spécifique correspondante, dans des conditions
permettant l'incorportation d'un AMP ou d'un ADP modifié
correspondant, dans ou sur ladite substance et, le cas
35 échéant, après élimination de l'excès d'ATP modifié
libre, à placer la composition obtenue dans des conditions permettant l'éventuel couplage des groupes de modification portés par l'AMP modifié ou l'ADP modifié incorporté à ladite substance, avec la molécule ou le produit

10

15

25

30

35

permettant la reconnaissance du groupe de modification du dérivé initial d'ATP et à détecter ou à doser la susdite substance éventuellement présente portant lesdits produits de reconnaissance.

Dans le cas d'aminoglycoside, le dosage mettra par conséquent en oeuvre une réaction qui peut être schématisée par l'équation suivante :

enzyme spécifique

R-OH + ATP-M R-O-ADP-M+Pi

ou encore pour d'autres substances comme les oses-1phosphate :

R-OH + ATP-M enzyme spécifique R-O-ADP-M+Pi.

Le dosage du composé R-O-AMP-M (ou du composé R-O-ADP-M), après élimination de l'éventuel excès d'ATP-M, est d'une sensibilité considérable. Dans le cas des antibiotiques, cette méthode permet de doser des quantités d'un nanogramme d'antibiotique.

Parmi les substances susceptibles d'être dosées par une telle méthode, on citera, outre les antibiotiques du type aminoglycosides, et à titre d'exemples, les oses-1-phosphate comme le galactose-1-phosphate (étude de la galactosémie) et le glucose 1-phosphate, l'acide N-acétylneuraminique, l'acide 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphorique ...

L'enzyme spécifique intervenant dans cette transformation sera en général constituéepar une adénylyltransférase, une acylneuraminate citidylyltransférase, une glucose 1-phosphate uridyltransférase, l'ATP phosphoribosyltransférase

Le groupe chimique lié de façon covalente à l'ATP peut revêtir les formes les plus diverses, dès lors qu'il possède un groupe permettant son couplage avec des substances affines permettant sa révélation, de préférence sous forme directement visualisable, et qu'il n'empêche pas l'enzyme susdite de catalyser l'incorporation du dérivé d'AMP ou d'ADP correspondant sur la susbtance sus-visée.

Parmi les groupes chimiques préférés suscep-

tibles d'être fixés sur les bases des susdits ribonucléotides, on mentionnera tout groupe susceptible d'être reconnu spécifiquement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, de préférence par une méthode de visualisation.

Cette autre molécule ou cet autre produit consiste par exemple en une enzyme, dont la présence peut être révélée par l'action qu'elle est susceptible d'exercer sur un substrat, de préférence un substrat



٠ سې

20

25

30

35

donnant lieu à des réactions de coloration ou de décoloration, ou plus généralement encore de modification de spectres d'absorption respectivement décelables par colorimétrie ou spectrophotométrie. On peut naturellement avoir recours à des molécules ou produits donnant lieu à des réactions de fluorescence, à des modifications de densité optique, etc., par exemple des produits comprenant des groupes dérivés de l'aminofluorène, du chlorure de dansyle, de la rhodamine, etc..

10 Parmi les groupes de modification appropriés, on mentionnera les groupes chimiques dont est connue l'affinité pour un autre type de molécule chimique. Parmi ces groupes de modification chimique, on peut mentionner la biotine ou l'avidine, dont on connaît les affinités réciproques, les groupes dérivés de l'une de ces molécules 15 pouvant servir à la modification du ribonucléctide choisi et l'autre de molécule couplable avec un réactif marqué par une enzyme ou susceptible d'être fixéeà une enzyme, par exemple dans les conditions décrites dans le brevet n° 78 10975 de l'INSTITUT PASTEUR déposé le 13 avril 1978. Ce réactif consiste par exemple en un anticorps spécifique dirigé contre le groupe de modification ou en une molécule ayant une affinité spécifique pour ledit groupe de modification.

Parmi les groupes de modification utiles du ribonucléotide initial, figurent également des antigènes ou haptènes susceptibles d'être reconnus par des anticorps préalablement formés contre ces antigènes ou contre ces haptènes, plus particulièrement lorsque ceux-ci ont été fixés au préalable sur une macromolécule support, telle qu'une sérum-albumine ou un polypeptide, par exemple une polylysine. Parmi ces antigènes ou haptènes, on peut citer la biotine et l'avidine elles-mêmes, des groupes acétylaminoflucrène, des peptides, hormones ou prostaglandines, notamment ceux auxquels correspondent des antisérums ou anticorps spécifiques, des lectines, dont est connue la capacité à être couplées à des enzymes permettant leur révélation, notamment des péroxydases, ß-galactosidases, etc... De tels sérums ou anticorps sont disponibles dans stra

116471160-,00---

Mais la molécule ou le produit présentant des caractéristiques d'affinité vis-à-vis du groupe de modification susdit, sert éventuellement aussi seulement de relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour, notamment dans les conditions sus-indiquées; par exemple le produit présentant les caractéristiques d'affinité, vis-à-vis du groupe de modification susdit, est constitué par un anticorps lui-même non marqué, mais reconnaissable à son tour par des anticorps contre lui-même, ces derniers anticorps étant eux-mêmes couplés à l'enzyme susceptible d'agir sur un substrat spécifique, dans les conditions classiques en matière de dosage immunoenzymatique.

D'une façon générale, le groupe de modification du ribonucléotide est constitué par toute molécule ou produit chimique fixable sur l'ATP et ensuite détectable dans les conditions qui ont été indiquées, dans la mesure où il répond aux conditions sus-indiquées. L'invention comprend également un test de reconnaissance des groupes compatibles. Ces groupes sont ceux qui n'empêchent pas la fixation de l'AMP modifié correspondant sur des aminoglycosides, notamment la tobramycine en présence d'adénylyl-transférase dans les conditions sus-indiquées, cet AMP modifié devant naturellement être fourni par l'ATP préalablement modifié par le groupe de modification étudié.

Le groupe de modification chimique sus-indiqué est fixé sur la position 6, de préférence 8, du groupe 30 adénine.

Cette fixation intervient avantageusement par l'intermédiaire d'un bras du type -NH-(CH₂)_x-X, ou -CO-(CH₂)_x-X, dans lequel x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, et X est un groupe assurant la liaison entre un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe. Les groupes CH₂ du bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condi-

15

25

35

tion naturellement que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.

Par exemple, si l'on considère le cas de la modification du groupe adénine de l'ATP n sa position 8, le ribonucléotide modifié obtenu peut être représenté par la formule (cas d'un bras du type $-NH-(CH_2)_{\nu}-X-)$:

dans laquelle R est un groupe triphosphate, x, X et M
ont les significations sus-indiquées. Avantageusement,
le groupe X est constitué par un groupe NH ou CO.

Un procédé pour fabriquer le dérivé de formule I, par exemple à partir de l'ATP préalablement bromé en position 8, consiste à le faire réagir dans les conditions appropriées, avec un composé de formule $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$, dans lequel Y représente un radical auquel sera ensuite substitué le groupe M susdit, notamment par la mise en œuvre d'une réaction de condensation avec une molécule MZ, au cours de laquelle est alors formé le produit de condensation de formule I, avec libération d'une molécule Y-Z.

Lorsque le groupe X est NH, Y est avantageusement de l'hydrogène. Lorsque X est CO, Y est avantageusement un hydroxyle. Z peut être constitué par tout groupe susceptible d'être détaché de M dans la susdite réaction de condensation, par exemple le fluor lorsque la molécule chimique donneuse du groupe recherché est le fluoro-1-dinitro-2,4 benzène, ou un hydroxyle

(A. -1-1-

10

ou de l'hydrogène dans le cas d'un peptide. Dans ce dernier cas, la fixation de ce peptide à l'extrémité du bras susdit peut, lorsque le groupe XY est constitué par un groupe NH2 ou COOH, être effectué par la mise en oeuvre de réactions de couplage, traditionnelles dans la chimie des protéines, entre groupes carboxyle et amine, respectivement portés par les deux éléments peptidiques distincts à coupler, par exemple par condensation en présence d'un agent de condensation, tel que le dicyclohexyl-carbodiimide ou après formation préalable d'un ester activé à la fonction carboxylique de celui de ces deux éléments peptidiques qui le portent.

La position 8 sur le cycle adénine de l'ATP 15 ne constitue évidemment pas le seul point sur lequel peut se brancher une chaîne porteuse d'un groupe de modification tel qu'il a été défini plus haut. A titre d'exemple, on peut également substituer l'un des atomes d'hydrogène porté par le carbone en position 6 du cycle 20 adénine par une chaîne porteuse de ce groupe. A titre d'exemple, on mentionnera la possibilité de substitution qui consiste à faire réagir avec l'ATP de l'acide iodoacétique ou un acide organique iodé équivalent, permettant la formation préalable d'un sel quaternaire, fai-25 sant intervenir l'azote en position 1, sel qui se transforme ensuite par chauffage en milieu basique à 35°C, à pH légèrement basique, notamment à pH 8, pendant le temps suffisant, par exemple 72 heures, en un produit de substitution de l'un des hydrogènes du groupe NH2 30 fixé sur le carbone en position 6 du groupe adénine (réaction du type connu sous l'expression "réarrangement de Dimroth").

On obtient alors (lorsque l'acide organique iodé est constitué par l'acide iodoacétique) le composé de formule II ci-après :



30

35

réaction avec le composé de formule $H_2N-(CH_2)_X-X-Y$ déjà défini plus haut, dans des conditions permettant la liaison chimique entre le groupe carbonyle initialement contenu dans le groupe carboxyle dans le composé de formule II et le groupe imino appartenant initialement à la fonction aminée du composé $H_2N-(CH_2)_X-X-Y$, lequel peut alors être couplé à son tour avec un composé de formule MZ, dans les conditions qui ont déjà été définies plus haut.

Il va de soi que tous les éléments qui précèdent ne visent qu'à illustrer des modes de préparation particuliers qui permettent de fixer sur l'ATP un groupe de modification choisi parmi ceux auxquels correspondent des molécules affines, comme cela a été défini plus haut.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'exemples de mises en oeuvre préférées de l'invention.

Préparation du 8-[-N-(dinitro-phényl)-amino-hexyl]aminoadénosine 5'-triphosphate.

On fait réagit du 8-(aminohexyl)-aminoadénosine 5'-triphosphate avec du fluoro-1-dinitro-2,4-benzène,

C 171 NO2700222

a l'i d'un mélange eau-éthan. 10/1 volumes 3, à pli 8,8, à 40°C, et en présence d'un sel, notamment chlorure, de magnésium. Le produit de réaction finalement obtenu a pour formule :

On récupère le dérivé de formule III, ciaprès dénommé ATP-DNP, après une purification comprenant
la fixation du ribonucléotide sur DEAE cellulose, élution avec un gradient de LiCl 0,2 N, pH 5,5, à LiCl
0,5 N, pH 2 et filtration sur tamis moléculaire du
type SEPHADEX G50. Le rendement réactionnel est de
52 %. Les fractions recueillies sont analysées par spectrophotemétrie d'absorption de rayonnements de longueurs d'onde de 280 et 360 nanomètres respectivement.

25 On recueille celle des fractions dont les densités optiques dans les deux susdits domaines de longueurs d'onde sont dans un rapport (DO₂₈₀/DO₃₆₀) égal à 4. Le produit contenu dans cette fraction correspond à celui résultant de la fixation de 1 mole de DNP sur 1 mole d'ATP. Il ne donne également qu'une tache dans un système de chromatographie en couche mince. Le produit de cette fraction est lyophilisé.

Ce produit présente la caractéristique d'être reconnu par des anticorps formés au préalable à l'égard de dinitro-2,4 benzène, qui avait préalablement été fixé sur un support macromoléculaire du type de la

sérum-albumine. Des anticorps de ce type sont par ailleurs disponibles dans le commerce.

Précaration du 3-(N-biotinyl-aminonexyl)aminoadénosine 5'-triphosphate.

On condense du 8-(aminohexyl)-amino-adénosine-5'-triphosphate avec le biotinyl-N-hydroxysuccinimideester, dans les conditions décrites par LANGER et al, telles qu'appliquées à la fábrication du biotinyl-UTP à partir de la 5-(3-amino)allyluridine. On obtient 10 alors le composé de formule :

Dosage de tobramycine.

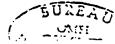
L'échantillon présumé contenir le susdit antibiotique est constitué par du sérum provenant d'un patient traité par un aminoglycoside. Ce sérum est préalablement déprotéinisé.

Cet échantillon est mis en solution dans une solu-30 tion tamponnée dont la composition est la suivante :

Tris HC1 50 mM, pH 7,5

MgCl₂ 10 mH, DTT 1 mM.

On ajoute à la solution ainsi formée 10 micromoles d'ATP-DNP et on laisse incuber pendant 1 heure à 37° C avec 10 U d'adénylyltransférase extraite de Staphilococcus



rivet ou de Escherichia coli R55.

Une partie du produit de réaction est alors prélevée, notamment par une pipette d'EPPENDORF (GILSON) comprenant dans sa partie inférieure un échangeur de cations capable de fixer l'antibiotique modifié par l'AMP-DNP, les autres constituants, y compris l'excès d'ATP-DNP et les phosphates organiques formés restant alors dans la solution.

L'échangeur de cations (Amberlite CG 50, 200-400 mcsh, forme NH₄+) est alors lavé avec la susdite solution tampon. L'antibiotique modifié est ensuite élué à partir de l'échangeur de cations, à l'aide d'une solution d'ammoniaque 1N. Le soluté obtenu est ensuite neutralisé avec HCl 1N.

Le dosage comprend alors finalement l'étape 15 consistant à mettre en contact la susdite solution avec un anticorps anti-DNP couplé à de la péroxydase, à recueillir l'éventuel complexe formé entre, d'une part, l'aminoglycoside dans lequel est incorporé le produit de dégradation de l'ATP-DNP, et, d'autre part, 20 le susdit anticorps et à le mettre en contact avec un substrat colorable de la péroxydase. La présence d'antibiotique est alors manifestée par la coloration du substrat de la péroxydase, coloration qui permet même de fournir des indications quantitatives concernant la 25 quantité d'antibiotique que contenait initialement l'échantillon traité.

Dans l'exemple considéré le substrat est avantageusement constitué par une solution contenant :

- de l'eau oxygénée : 10 µl d'H₂O₂ à 110 volumes,
- de l'acétate de potassium : 9,5 ml 0,05H, pH 5,1,
- du 3-amino-9-éthylcarbazole : 2 mg dissous dans 0,5 ml de N-N'-diméthylformamide.

On peut par cette méthode doser des quantités de l'ordre du nanogramme par millilitre du susdit aminoglycoside.

L'invention ne se limite évidemment pas aux modes de réalisation décrits ci-dessus à titre

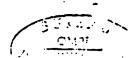
35



d'exemples et l'homme de l'art peut y apporter des modifications sans pour autant sortir du cadre des revendications ci-après.

REVENDICATIONS

- 1 ATP modifié résultant de la fixation covalente sur la position 6, ou de préférence 8, du groupe adénine de l'ATP, d'un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe, par l'intermédiaire d'un bras du type -NH-(CH₂)_x-X, ou -CO-(CH₂)_x-X, dans lequel X est un groupe assurant la liaison avec le susdit groupe M et x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12, à condition que x soit distinct de 2 lorsque M est un groupe dinitro-2,4-phényle.
 - 2 ATP modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est susceptible d'être reconnu spécifiquement et directement par une autre molécule ou par un produit, lui-même aisément détectable, par une méthode de visualisation.
- 3 ATP modifié selon la revendication 2, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification est constitué par un antigène ou un haptène susceptible d'être reconnu par un anticorps préalablement formé contre cet anti-20 gène ou contre cet haptène.
 - 4 ATP modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification sert de relais vis-à-vis d'une autre molécule ou d'un autre produit susceptible d'être visualisé à son tour.
- 5 ATP modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification ou, selon le cas, la susdite molécule relais, est couplable chimiquement avec une molécule affine marquée par une enzyme ou immunologiquement avec un anticorps marqué par une enzyme et ayant une affinité sélective pour ledit groupe de modification ou la susdite molécule relais.
 - 6 ATP modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les groupes CH₂ du



PCT/FR82/00222

bras susdit peuvent en partie être remplacés par des groupes CO ou NH, à condition que ces groupes de remplacement ne soient pas adjacents à des groupes identiques.

- 7 ATP modifié selon l'une quelconque des re-5 vendications 1 à 6, caractérisé en ce que le susdit groupe de modification comprend un groupe dérivé de la biotine, de l'avidine ou un groupe dinitro-2,4-phényle.
- 8 Procédé de détection ou de dosage d'une substance appartenant à la catégorie de substances biolo10 giques, telles que certains antibiotiques plus particulièrement ceux de la classe des aminoglycosides, qui sont capables, en présence d'enzymes spécifiques, d'incorporer de l'ADP ou de l'AMP, ces dernières molécules étant susceptibles d'être fournies à ces substances biologiques à partir d'ATP en présence d'une enzyme spécifique appropriée, caractérisé par les étapes qui consistent:
- à mettre la composition présumée contenir la substance recherchée avec un réactif contenant un ATP modifié par une molécule chimique fixée de façon covalente au cycle adénine de cet ATP et portant au moins un groupe non engagé dans la liaison covalente susdite et couplable directement ou indirectement avec une molécule ou un produit ayant une affinité spécifique pour ce groupe et permettant sa reconnaissance, ledit groupe étant en outre tel qu'il n'empêche pas l'ATP modifié qui le porte à fournir l'AMP modifié ou l'ADP modifié correspondant dans une forme incorporable dans ladite substance recherchée,
- à placer, le cas échéant, après élimination des ATP modifiés libres, la composition obtenue dans des conditions permettant l'éventuel couplage des groupes de modification portés par l'AMP modifié ou l'ADP modifié incorporé à ladite substance, avec la molécule ou le produit permettant la reconnaissance du groupe de modification du dérivé initial d'ATP, et



- à détecter ou à doser la susdite substance éventuellement présente portant lesdits produits de reconnaissance.
- 9 Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le réactif utilisé contient un ATP modifié 5 résultant de la fixation covalente sur la position 6, ou de préférence 8, du groupe adénine de l'ATP d'un groupe M, choisi parmi ceux qui sont susceptibles d'une réaction de liaison avec un agent chimique ou immunologique ayant une affinité sélective pour ce groupe, par l'intermédiaire
- d'un bras du type $-NH-(CH_2)_X-X$, ou $-CO-(CH_2)_X-X$, dans lequel X est un groupe assurant la liaison avec le susdit groupe M et x varie de 2 à 20, notamment de 6 à 12.
- 10 Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le réactif utilisé contient un ATP modi-15 fié conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/F	R 82/00222
	SIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several crassifi		
According	g to International Patent Classification (IPC) or to both Natio	inal Classification and IPC	· · · ·
Int. C	1.3: C 07 H 19/20; G 01 N 53/50; C 12 Q 1/00		
II. FIELD	S SEARCHED		
	Minimum Document	tation Searched 4	
Classificati	ion System C	Classification Symbols	
			· · · .
Int. Cl	.3 C 07 H 19/00		
	Documentation Searched other th	nan Minimum Documentation are included in the Fields Searched •	
	to die Cacin the Cook of the		
		· ·	
III. DOCI	UMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT 14		
Category *	Citation of Document, 16 with indication, where appr	opriate, of the relevant passages 17	Relevant to Claim No. 18
	· ·		
X, Y	DE, A, 2618511 (MILES) 04 November 1976,	see pages 34-119	1-9
X, Y	DE, A, 2618419 (MILES) 04 November 1976,	see pages 34-62	1-9
Y	US, A, 4255566 (R.J.CARRICO et al.) 10 Marc 70; columns 3, 4	ch 1981, see column 2, lines 50-	1-7
		•	
			İ
•			
			İ
	,		
		•	
"Å" do	is categories of cited documents: 13 cument defining the general state of the art which is not	"T" later document published after for originty date and not in conflicted to understand the princip	ict with the application but
CO	nsidered to be of particular relevance fier document but published on or after the international	invention	
fili	ng date	"X" document of particular relevant cannot be considered novel of	caunot pe considered to
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another		involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention	
-07 do	ation or other special reason (as specified) cument referring to an oral disclosure, use, exhibition or	cannot be considered to involve	an inventive stop when the
"P" do	ner means cument published grior to the international filing date but	ments, such combination being in the art. "6" document member of the same	
	er than the priority date claimed	4 Additional manual At the some	
	TIFICATION THE Actual Completion of the International Search *	Date of Mailing of this International S	earen Report s
	arch 1983 (16.03.83)	31 March 1983 (31.03.83	
Internatio	nal Soarching Authority 1	Signature of Authorized Officer 20	
Europ	ean Patent Office		





RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

	Demanda Internationale N° PCT/FR				
	EMENT DE L'ILIVENTION (si piusiaurs symboles de classification aont applicables, los Indiquer	tous) s			
	assification internationale des brevers (CIS) ou à la fois eclon la cleanification nationale et la CIB				
CIB.3	C 07 H 19/20; G 01 N 53/50; C 12 Q 1/00				
IL DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE					
Documentation minimale consultée 4					
Systeme	de classification Symboles de classification				
CIB. ³ :	C 07 H 19/00	. ·			
	Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tals documents font partie des comaines sur lesquois la recherche a porté è				
III. DOCU	MENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS 14				
Catégorie *	Identification des documents cités,14 avec Indication, al nécessaire, des passages pertinents 17	N° des revendications visées 18			
X,Y	DE, A, 2618511 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-119	1-9			
Х,Ү	DE, A, 2618419 (MILES) 4 novembre 1976 voir pages 34-62	1-9			
. У	US, A, 4255566 (R.J. CARRICO et al.) 10 mars 1981 voir colonne 2, lignes 50-70; colonnes 3,4	1-7			
Catégories spéciales de documents cités: 15 «A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent «E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date «L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date do publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (tello qu'indiquee) «O » document se référant à une divulgat'on orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens «P » document publié avant la date de dépôt international, mais posièrieurement à la date de priorité revendiquee IV. CERTIFICATION «T » document ultériour publié postérieurement à la date de dépôt internation ou à la date de priorité de la tachnique portinent; mais cité pour comprenére le principe ou la théorie constituant la base de l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive lorsque le ducument pertinent; l'invention revendiquee ne pout être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le ducument est associé à un ou priseurs autres documents de même nature, cetto combination de province l'experiment particulièrement pour une personne du métier. «Y » document publié postérieurement à la date de dépôt internation de la tachnique portinent; l'invention revendiquée ne pout être considérée comme nouvelle ou comme activité inventive lorsque le ducument est associé à un ou priseurs autres document qui fait partie de la même famille de brevets IV. CERTIFICATION Date d'expedition du présent rapport de racyarche internationale 3 document qui fait partie de la même famille de brevets					
Administratio	mars 1983 a chargée de la recherche internationale i Signature du fonctionnaire autorisé				

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuilte) (Octobre 1931)